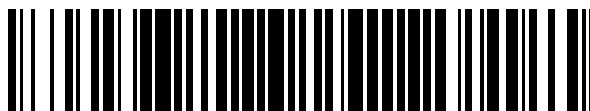


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 017**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10177790 .2**  
96 Fecha de presentación: **19.04.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2302075**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Procedimiento para el tipado de alelos de HLA**

30 Prioridad:  
**20.04.1998 EP 98870088**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.11.2012**

73 Titular/es:  
**INNOGENETICS N.V. (100.0%)**  
**Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4**  
**9052 Ghent, BE**

72 Inventor/es:  
**DE CANCK, ILSE**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 390 017 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el tipado de alelos de HLA

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al tipado de alelos del antígeno leucocitario humano (HLA). Más particularmente, la presente invención se refiere al tipado de nuevos alelos de HLA.

**Antecedentes de la invención**

10 El complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) humano está contenido dentro de aproximadamente 4 Mpb de ADN en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3 (Campbell y Trowsdale, 1993). El MHC humano se divide en las regiones de clase I, clase II y clase III. Los genes de la clase I y la clase II codifican moléculas de la superficie celular altamente polimórficas que se unen y presentan antígenos procesados en forma de péptidos a linfocitos T, iniciando respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales. Las moléculas de clase I, HLA-A, -B, y -C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glucoproteínas de la superficie celular que se unen y presentan péptidos procesados derivados de proteínas endógenamente sintetizadas a linfocitos T CD8+. Estos heterodímeros consisten en una cadena  $\alpha$  codificada por HLA asociada a un polipéptido monomórfico codificado por no MHC, la  $\beta_2$ -microglobulina (Townsend y Bodmer, 1989; Spencer y Parham, 1996). Las moléculas de clase II están codificadas en la región de HLA. Estas glucoproteínas de la superficie celular consisten en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por HLA asociadas como heterodímeros sobre la superficie celular de células presentadoras de antígeno tal como linfocitos B y macrófagos. Las moléculas de clase II sirven de receptores para péptidos procesados. Sin embargo, estos péptidos se derivan predominantemente de proteínas de membrana y extracelulares y se presentan a linfocitos T CD4+. La región HLA-D contiene varios genes de clase II y tiene tres subregiones principales: HLA-DR, -DQ y -DP. Tanto las regiones HLA-DQ como -DP contienen un gen funcional para cada una de sus cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subregión HLA-DR contiene un gen funcional para la cadena  $\alpha$ ; el número de genes funcionales para la cadena  $\beta$  varía de uno a dos según el haplotipo (Andersson y col., 1987; Apple y Erlich, 1996).

25 Actualmente se usan una variedad de técnicas para detectar polimorfismo de HLA, que incluyen procedimientos serológicos, bioquímicos, de reconocimiento de linfocitos T y, más recientemente, de biología molecular.

30 La serología sigue siendo el procedimiento pilar para el tipado de HLA - especialmente para la clase I - para muchos laboratorios de histocompatibilidad rutinaria. El ensayo de micro-linfocitotoxicidad (Kissmeyer y col., 1969; Terasaki y McClelland, 1964) es el enfoque convencional: células mononucleares de sangre periférica viables (clase I) o linfocitos T separados (clase II) se mezclan con antisueros (policlonales o monoclonales) de especificidad por HLA conocida.

La detección del polimorfismo puede lograrse considerando la diferente composición de aminoácidos de moléculas de HLA por técnicas bioquímicas tales como isoelectroenfoque unidimensional (IEF; Yang, 1987). Este procedimiento se basa en sustituciones de aminoácidos que contribuyen a cambios en la carga de la molécula de HLA.

35 Otro procedimiento de tipado de HLA es la reacción de linfocitos mixtos (MLR). Simultáneamente a observaciones que se hacen usando antisueros específicos para HLA, se observó que los linfocitos de dos fuentes sin relacionar proliferaban cuando se mezclaban en cultivo (Hirschorn y col., 1963).

40 El análisis de especificidades por HLA de ADN proporcionó un nuevo enfoque para definir sus diferencias polimórficas. En vez de considerar diferencias en la molécula expresada, el polimorfismo se caracteriza al nivel de nucleótidos.

45 Un desarrollo importante y poderoso en el campo de la molecular biología ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona, 1987). En tipado de tejido, la PCR se usa para amplificar las regiones polimórficas de genes HLA. Este producto de PCR de HLA puede luego analizarse para sus diferencias polimórficas, para establecer el tipo de tejido. Se han desarrollado varios de tales enfoques, que incluyen análisis de heterodúplex de productos de PCR (Clay y col., 1994), análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios del producto de PCR (PCR-SSCP; Yoshida y col., 1992), tipado basado en secuencias (SBT; Santamaria y col., 1992 y 1993), el uso de cebadores específicos para secuencia en la reacción de PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con sondaje de oligonucleótidos específicos para secuencia (PCR-SSOP; Saiki y col., 1986) o sondaje por transferencia puntual inversa (Saiki y col., 1989). Estos enfoques, usados individualmente o en combinación, se han aplicado todos como procedimientos basados en ADN para el tipado de tejido de especificidades por HLA de clase I y clase II.

55 El documento US 5.545.526 proporciona un procedimiento para el tipado de secuencias de HLA específicas, y otras secuencias genéticas que presentan polimorfismo similar pueden detectarse por amplificación específica para secuencias (SSA). En esencia, los cebadores usados para llevar a cabo la amplificación se eligen para representar secuencias que distinguen un alelo de otro. Como resultado, el alelo se detecta si se produce la amplificación, y está

ausente si no se produce la amplificación.

Para alelos de clase I, las regiones hipervariables se encuentran en diferentes grados en tanto el exón 2 como el exón 3, que codifican el surco de unión a péptido de la molécula de clase I. El polimorfismo dentro de la clase II está contenido principalmente dentro de regiones hipervariables definidas en el exón 2. Estos polimorfismos hacen diferenciación entre alelos que pueden conseguirse por hibridación con sondas relevantes.

5

### Objetivos de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de amplificación, como se enumera en las reivindicaciones.

10 Es un objetivo más específico de la presente invención proporcionar un procedimiento para el tipado de dichos alelos, comprendiendo dicho procedimiento además una etapa de hibridación.

También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar cebadores para dicha etapa de amplificación.

También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar sondas para dicha etapa de hibridación.

15 También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un kit de diagnóstico que permita dicho procedimiento para el tipado.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar los fragmentos de proteínas codificados por lo genes HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente memoria descriptiva desvela un antisuero o un ligando que se une al fragmento de proteína según la invención. El término "un ligando" se refiere a cualquier molécula que puede unirse al fragmento de proteína de la presente invención. El último término se refiere específicamente a anticuerpos policlonales y/o monoclonales producidos específicamente (mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica) contra el fragmento de proteína de la presente invención y también engloba cualquier construcción similar a anticuerpo, y otras, como se describe en detalle en el documento WO 98/58965 a Lorré y col.

25 La presente invención desvela adicionalmente un kit para la detección de uno o más de los fragmentos de proteínas de la invención, que comprende al menos un antisuero o un ligando como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también desvela la secuencia del exón 2 y del exón 3 del alelo de HLA B\*3913. Estas secuencias se identifican por SEC ID N° 22 y 23 y se muestran a continuación.

10	20	30	40	50	60
GCTCCCACTC	CATGAGGTAT	TTCTACACCT	CCGTGTCCCG	GCCCGGCCGC	GGGGAGCCCC
70	80	90	100	110	120
GCTTCATCTC	AGTGGGCTAC	GTGGACGACA	CGCAGTTCGT	GAGGTTTCGAC	AGCGACGCCG
130	140	150	160	170	180
CGAGTCCGAG	AGAGGAGCCG	CGGGCGCCGT	GGATAGAGCA	GGAGGGGCCG	GAGTATTGGG
190	200	210	220	230	240
ACCGGGAGAC	ACAGATCTCC	AAGACCAACA	CACAGACTTA	CCGAGAGAGC	CTGCGGAACC
250	260	270			
TGCGCGGCTA	CTACAACCAG	AGCGAGGCCG			

exón 2 (SEC ID N° 22)

ES 2 390 017 T3

```

10          20          30          40          50          60
GGTCTCACAC CCTCCAGAGG ATGTACGGCT GCGACGTGGG GCCGGACGGG CGCCTCCTCC
70          80          90          100         110         120
GCGGGCATAA CCAGTTCGCC TACGACGGCA AGGATTACAT CGCCCTGAAC GAGGACCTGA
130         140         150         160         170         180
GCTCCTGGAC CGCGGCGGAC ACCGCGGCTC AGATCACCCA GCGCAAGTGG GAGGCGGCC
190         200         210         220         230         240
GTGTGGCGGA GCAGCTGAGA ACCTACCTGG AGGGCACGTG CGTGGAGTGG CTCCGCAGAT
250         260         270
ACCTGGAGAA CGGGAAGGAG ACGCTGCAGC GCGCGG
exón 3 (SEC ID Nº 23)

```

Estas secuencias se muestran de 5' a 3'. Estas secuencias han sido presentadas a la base de datos EMBL y se les asignó el número de acceso AJ223282. El alelo HLA-B\*3913 es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

- 5 La presente invención también desvela la secuencia del exón 2 y del exón 3 del alelo de HLA B\* 1406. Estas secuencias se identifican por SEC ID Nº 72 y 73 y se muestran a continuación.

```

10          20          30          40          50          60
GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCTACACCG CCGTGTCCCG GCCCGGCCGC GGGGAGCCCC
70          80          90          100         110         120
GCTTCATCTC AGTGGGCTAC GTGGACGACA CGCAGTTCGT GAGGTTCGAC AGCGACGCCG
130         140         150         160         170         180
CGAGTCCGAG AGAGGAGCCG CGGGCGCCGT GGATAGAGCA GGAGGGGCCG GAATATTGGG
190         200         210         220         230         240
ACCGGAAACAC ACAGATTCTGC AAGACCAACA CACAGACTGA CCGAGAGAGC CTGCGGAACC
250         260         270
TGCGCGGCTA CTACAACCAG AGCGAGGCCG
exón 2 (SEC ID Nº 72)

```

```

10          20          30          40          50          60
GGTCTCACAC CCTCCAGAGG ATGTACGGCT GCGACGTGGG GCCGGACGGG CGCCTCCTCC
70          80          90          100         110         120
GCGGGTATAA CCAGTTCGCC TACGACGGCA AGGATTACAT CGCCCTGAAC GAGGACCTGA
130         140         150         160         170         180
GCTCCTGGAC CGCGGCGGAC ACCGCGGCTC AGATCACCCA GCGCAAGTGG GAGGCGGCC
190         200         210         220         230         240
GTGAGGCGGA GCAGCTGAGA GCCTACCTGG AGGGCACGTG CGTGGAGTGG CTCCGCAGAC
250         260         270
ACCTGGAGAA CGGGAAGGAG ACGCTGCAGC GCGCGG
exón 3 (SEC ID Nº 73)

```

Estas secuencias se muestran de 5' a 3'. Estas secuencias han sido presentadas a la base de datos EMBL y se les

## ES 2 390 017 T3

asignaron los números de acceso AJ 131193 para el exón 2 y AJ 131194 para el exón 3. El alelo HLA-B\*1406 es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

La presente invención también desvela la secuencia del exón 2 y del exón 3 del alelo de HLA B\*51new. Estas secuencias se identifican por SEC ID N° 74 y 75 y se muestran a continuación.

```

      10           20           30           40           50           60
5  GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCTTACACCG CCATGTCCCG GCCCGGCCGC GGGGAGCCCC

      70           80           90           100          110          120
GCTTCATTGC AGTGGGCTAC GTGGACGACA CCAGTTCGT GAGGTTCGAC AGCGACGCCG

      130          140          150          160          170          180
CGAGTCCGAG GACGAGCCG CGGGCGCCAT GGATAGAGCA GGAGGGGCCG GAGTATTGGG

      190          200          210          220          230          240
ACCGGAACAC ACAGATTCTTC AAGACCAACA CACAGACTTA CCGAGAGAAC CTGCGGATCG

      250          260          270
CGCTCCGCTA CTACAACCAG AGCGAGGCCG          exon 2          exón 2 (SEC ID N° 74)

      10           20           30           40           50           60
GGTCTCACAC TTGGCAGACG ATGTATTGGCT GCGACGTGGG GCCGGACGGG CGCTCTCTCC

      70           80           90           100          110          120
CCGGGCATAA CCAGTACGCC TACGACGGCA AAGATTACAT CGCCCTGAAC GAGGACTGA

      130          140          150          160          170          180
GCTCCTGGAC CGCGGCGGAC ACCGCGGCTC AGATCACCCA GCGCAAGTGG GAGGCGGCCC

      190          200          210          220          230          240
GTGAGGCGGA GCAGCTGAGA GCCTACCTGG AGGGCTTGTG CGTGGAGTGG CTCCGCAGAC

      250          260          270
ACCTGGAGAA CGGAAGGAG TCGCTGCAGC GCGCGG          exón 3 (SEC ID N° 75)

```

Estas secuencias se muestran de 5' a 3'. El alelo HLA-B\*51new es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

- 10 Teniendo conocimiento de esta información de secuencias, el experto podrá idear procedimientos que permitan el tipado de dichos alelos. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento:
- i) amplificar un fragmento de dicho alelo que comprende todo o parte del exón 2 y/o todo o parte del exón 3 de dicho alelo usando al menos un par adecuado de cebadores;
  - 15 ii) determinar la ausencia o presencia de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new en la muestra.

20 Según una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new en una muestra, en el que la presencia o ausencia de los alelos se determina usando un conjunto de sondas, hibridándose las sondas de dicho conjunto específicamente con regiones diana que comprenden uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o en el exón 3 de dichos alelos.

Los cebadores usados en este procedimiento pueden ser cebadores genéricos, es decir, cebadores que se hibridan con regiones diana que están conservadas, al menos hacia su extremo 3', entre todos los alelos de un locus dado

(por ejemplo, los alelos de HLA-A o los alelos de HLA-B o los alelos de HLA-C) y, por tanto, conducirán a la amplificación de todos los alelos de este locus. Alternativamente, los cebadores pueden ser específicos para subgrupo, es decir, cebadores que se hibridan con secuencias diana que sólo están presentes en un subgrupo de alelos. Estos cebadores específicos para subgrupo pueden usarse por separado, o pueden usarse más de un cebador de 5' o más de un cebador del extremo 3' juntos en una mezcla. Una mezcla tal se llama algunas veces un cebador múltiple. Pueden usarse diferentes tipos de cebadores en combinación, por ejemplo, puede usarse un cebador de 5' múltiple con un cebador de 3' genérico.

Según una realización más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque los cebadores usados se eligen de la Tabla 5.

10 **Tabla 5. Cebadores para la amplificación del exón 2/exón 3 del alelo de HLA B\*3913, el alelo de HLA B\*1406 y/o el alelo de HLA B\*51new.**

Nombre	Secuencia	SEC ID N°
IBPIN1	GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAC (S=G o C)	SEC ID N° 26
IBPIN3	GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	SEC ID N° 27

IBPIN1 es un cebador de 5' localizado en la dirección 5' del exón 2 e IBPIN3 es un cebador de 3' localizado en la dirección 3' del exón 3. Éstos son cebadores genéricos, que permiten la amplificación de un fragmento de los 274 alelos de HLA-B que actualmente se conocen (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>).

Según otra realización más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado adicionalmente porque:

15 dichos nucleótidos polimórficos tienen las siguientes posiciones en el exón 2:

11, 24, 30, 33, 44, 46, 68, 69, 71, 88, 92, 94, 102, 120, 131, 132, 133, 136, 140, 149, 153, 155, 161, 173, 174, 183, 186, 188, 190, 193, 196, 197, 198, 199, 200, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 212, 219, 226, 228, 229, 236, 238, 240, 241, 244, 246, 268, y/o

dichos nucleótidos polimórficos tienen las siguientes posiciones en el exón 3:

20 2, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 26, 36, 44, 54, 66, 68, 69, 75, 76, 77, 92, 120, 134, 141, 142, 145, 156, 159, 163, 169, 184, 195, 196, 197, 201, 214, 216, 217, 227, 228, 229, 240.

Estos nucleótidos polimórficos se muestran en negrita en las secuencias anteriores (SEC ID N° 22 y 23, SEC ID N° 72 y 73, y SEC ID N° 74 y 75).

25 Según otra realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo HLA-B\*3913 se eligen de la Tabla 6.

**Tabla 6. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*3913.**

Referencia	Secuencia <sup>1</sup>	SEC ID N°
56	GGGACACGGAGGTGTAGA	SEC ID N° 28
92	CCGGCCCGGCCGCGGG	SEC ID N° 29
2	GCTTCATCTCAGTGGGCT	SEC ID N° 30
HC	GTTCGTGAGGTTGACA	SEC ID N° 31
7	GAGTCCGAGAGAGGAGCCG	SEC ID N° 32
87	GGCCGGAGTATTGGGAC	SEC ID N° 33
10	GGACCGGGAGACACAGAT	SEC ID N° 34
13	AGATCTCCAAGACCAAC	SEC ID N° 35

ES 2 390 017 T3

18	CACAGACTTACCGAGAG	SEC ID N° 36
19	ACCGAGAGAGCCTGCGG	SEC ID N° 37
50	CGGAACCTGCGCGGCTA	SEC ID N° 38
26	AGAGGATGTACGGCTGC	SEC ID N° 39
	GACGTGGGGCCGGACG	SEC ID N° 40
91	GACGGGCGCCTCCTCCG	SEC ID N° 41
28	TCCTCCGCGGGCATAACCAG	SEC ID N° 42
53	GGGCATAACCAGTTCGCCT	SEC ID N° 43
90	GAGGACCTGAGCTCCTGG	SEC ID N° 44
38	CGGCCCGTGTGGCGGAG	SEC ID N° 45
88	GCAGCTGAGAACCTACCT	SEC ID N° 46
36	TGGAGGGCACGTGCGTG	SEC ID N° 47
	CGTGGAGTGGCTCCGC	SEC ID N° 48
	TCCGCAGATACCTGGAGA	SEC ID N° 49
<sup>1</sup> Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.		

Estas sondas se hibridan con regiones diana que comprenden nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo B\*3913. Todas las sondas son sondas sentido, es decir, que se hibridan con la cadena no codificante, excepto la sonda con SEC ID N° 28, que es una sonda antisentido. Las sondas con SEC ID N° 28 a 49 se han optimizado para funcionar bajo las mismas condiciones en un ensayo de LiPA (véase más adelante).

Según otra realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo HLA-B\*1406 se eligen de la Tabla 7.

10 **Tabla 7. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*1406.**

Referencia	Secuencia <sup>1</sup>	SEC ID N°
B75	TCTACACCGCGTGTCC	SEC ID N° 76
B92	CCGGCCCGGCCGCGGG	SEC ID N° 29
B2	GCTTCATCTCAGTGGGCT	SEC ID N° 30
B85	GCGACGCCGCGAGTCCGA	SEC ID N° 77
B7	GAGTCCGAGAGAGGAGCCG	SEC ID N° 32
B98	GGCCGGAATATTGGGAC	SEC ID N° 78
B9	GGACCGGAACACACAG	SEC ID N° 79
B16	ACAGATCTGCAAGACCA	SEC ID N° 80
B17	ACAGACTGACCGAGAG	SEC ID N° 81
B19	ACCGAGAGAGCCTGCGG	SEC ID N° 37
B56	GGAACCTGCGCGGCTACTA	SEC ID N° 82

## ES 2 390 017 T3

B26	AGAGGATGTACGGCTG	SEC ID N° 83
B89	CGACGTGGGGCCGGACG	SEC ID N° 84
B91	GACGGGCGCCTCCTCCG	SEC ID N° 41
B63	GGGTATAACCAGTTCGCCT	SEC ID N° 85
B90	AGGACCTGAGCTCCTGG	SEC ID N° 86
B31	GCCCGTGAGGCGGAGC	SEC ID N° 87
B66	GCAGCTGAGAGCCTACCT	SEC ID N° 88
B36	TGGAGGGCACGTGCGTG	SEC ID N° 47
B88	CGTGGAGTGGCTCCGC	SEC ID N° 48
B70	CCGCAGACACCTGGAGA	SEC ID N° 89
<sup>1</sup> Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.		

Estas sondas se hibridan con regiones diana que comprenden nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo B\*1406. Todas las sondas son sondas sentido, es decir, que se hibridan con la cadena no codificante. Las sondas con SEC ID N° 30, 32, 79, 80, 81, 37, 82, 83, 87, 47 y 89 han sido optimizadas para funcionar bajo las mismas condiciones en un ensayo de LiPA (véase más adelante).

Según otra realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo HLA-B\*51new se eligen de la Tabla 8.

**Tabla 8. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*51new.**

Referencia	Secuencia <sup>1</sup>	SEC ID N°
B3	GCTTCATTGCAGTGGGCT	SEC ID N° 90
B6	CGAGTCCGAGGACGGAGCCCCGG	SEC ID N° 91
B9	GGACCGGAACACACAG	SEC ID N° 79
B14	CAGATCTTCAAGACCAAC	SEC ID N° 92
B18	CACACAGACTTACCGAGAG	SEC ID N° 93
B51	CGAGAGAACCTGCGGATC	SEC ID N° 94
B55	CGGATCGCGCTCCGCTA	SEC ID N° 95
B73	TCTACACCGCCATGTCC	SEC ID N° 96
B85	GCGACGCCGCGAGTCCG	SEC ID N° 97
B87	GGCCGGAGTATTGGGAC	SEC ID N° 33
B23	ACACTTGGCAGACGATG	SEC ID N° 98
B31	GCCCGTGAGGCGGAGC	SEC ID N° 87
B35	GGAGGGCCTGTGCGTG	SEC ID N° 99
B60	CATAACCAGTACGCCTACG	SEC ID N° 100
B70	CCGCAGACACCTGGAGA	SEC ID N° 89



Referencia	Secuencia <sup>1</sup>	SEC ID N°
B88	GTGGAGTGGCTCCGC	SEC ID N° 101
B89	CGACGTGGGGCCGGACG	SEC ID N° 84
B90	GAGGACCTGAGCTCCTGG	SEC ID N° 44
B91	GACGGGCGCCTCCTCC	SEC ID N° 102
<sup>1</sup> Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.		

Estas sondas se hibridan con regiones diana que comprenden nucleótidos polimórficos en el exón 2 o el exón 3 del alelo B\*51new. Todas las sondas son sondas sentido, es decir, que se hibridan con la cadena no codificante, excepto la sonda con SEC ID N° 97, que es una sonda antisentido. Las sondas con SEC ID N° 90, 91, 79, 92, 93, 98, 87, 99, 94, 95, 100 y 89 han sido optimizadas para funcionar bajo las mismas condiciones en un ensayo de LiPA (véase más adelante).

El experto reconocerá que las sondas y cebadores con SEC ID N° 26 a 49 y SEC ID N° 76 a 102 pueden adaptarse mediante la adición o delección de uno o más nucleótidos en sus extremidades. Tales adaptaciones pueden requerirse, por ejemplo, si las condiciones de amplificación o hibridación cambian, o si el material amplificado es ARN en lugar de ADN, como es el caso en el sistema NASBA.

Pueden aplicarse diferentes técnicas para realizar los procedimientos de la presente invención. Estas técnicas pueden comprender inmovilizar los ácidos polinucleicos de HLA, posiblemente después de la amplificación, sobre un soporte sólido y realizar la hibridación con sondas de oligonucleótidos marcadas. Alternativamente, las sondas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido y la hibridación puede realizarse con ácidos polinucleicos de HLA marcados, posiblemente después de la amplificación. Esta técnica se llama hibridación inversa. Una técnica de hibridación inversa conveniente es el ensayo de sonda en línea (LiPA). Este ensayo usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas paralelas sobre una tira de soporte sólido (Stuyver y col., 1993). Debe entenderse que cualquier otra técnica para la detección del alelo de HLA anteriormente mencionado también está cubierta por la presente invención.

La presente divulgación también se refiere a cualquier cebador o cualquier sonda como se indica anteriormente para su uso en un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new. La divulgación se refiere además a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 22, correspondiente al exón 2 del alelo HLA-B\*3913, y a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 23, correspondiente al exón 3 de dicho alelo, o a cualquier fragmento de dichos ácidos polinucleicos que pueden usarse como un cebador o como una sonda en un procedimiento para el tipado de dicho alelo. La divulgación también se refiere a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 72, correspondiente al exón 2 del alelo HLA-B\*1406, y a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 73, correspondiente al exón 3 de dicho alelo, o a cualquier fragmento de dichos ácidos polinucleicos que pueden usarse como un cebador o como una sonda en un procedimiento para el tipado de dicho alelo. La divulgación también se refiere a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 74, correspondiente al exón 2 del alelo HLA-B\*51new, y a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 75, correspondiente al exón 3 de dicho alelo, o a cualquier fragmento de dichos ácidos polinucleicos que pueden usarse como un cebador o como una sonda en un procedimiento para el tipado de dicho alelo.

Además, teniendo acceso a los ácidos polinucleicos aislados definidos por SEC ID N° 22 y SEC ID N° 23, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-B\*3913 completo de una biblioteca genómica humana. Teniendo acceso a los ácidos polinucleicos aislados definidos por SEC ID N° 72 y SEC ID N° 73, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-B\*1406 completo de una biblioteca genómica humana. Teniendo acceso a los ácidos polinucleicos aislados definidos por SEC ID N° 74 y SEC ID N° 75, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-B\*51new completo de una biblioteca genómica humana. Esto puede hacerse cribando la biblioteca con respectivamente los ácidos polinucleicos definidos por SEC ID N° 22 ó 23, los ácidos polinucleicos definidos por SEC ID N° 72 ó 73 o los ácidos polinucleicos definidos por SEC ID N° 74 ó 75, o por cualquier fragmento adecuado de los mismos como una sonda de hibridación. Por tanto, la presente invención también se refiere al gen HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y HLA-B\*51new completo.

Según otra realización preferida, la presente divulgación se refiere a un kit de diagnóstico que permite el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new, comprendiendo dicho kit al menos un cebador y/o al menos una sonda como se indica anteriormente. Opcionalmente, este kit también puede comprender una enzima y/o reactivos que permiten la etapa de amplificación y/o reactivos que permiten la etapa de hibridación.

Según otra realización preferida, la presente invención se refiere a los fragmentos de proteínas que están codificados por SEC ID N° 22 o SEC ID N° 23. La secuencia de estos fragmentos puede obtenerse convirtiendo las

secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID N° 22 ó 23 en las secuencias de aminoácidos correspondientes. Las secuencias de aminoácidos se muestran a continuación como SEC ID N° 24 y 25, respectivamente.

GSHSMRYFYT SVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFSDA ASPREEPRAP  
 WIEQEGPEYW DRETQISKTN TQTYRESLRN LRGYYNQSEA (SEC ID N° 24)

GSHTLQRMYG CDVGPDGRLR RGHNQFAYDG KDYIALNEDL SSWTAADTAA  
 QITQRKWEAA RVAEQLRTYL EGTCVEWLRR YLENGKETLQ RA (SEC ID N° 25)

- 5 Según otra realización preferida, la presente invención se refiere a los fragmentos de proteínas que están codificados por SEC ID N° 72 o SEC ID N° 73. La secuencia de estos fragmentos puede obtenerse convirtiendo las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID N° 72 ó 73 en las secuencias de aminoácidos correspondientes. Las secuencias de aminoácidos se muestran a continuación como SEC ID N° 103 y 104, respectivamente.

GSHSMRYSYT AVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFSDA ASPREEPRAP  
 WIEQEGPEYW DRNTQICKTN TQTDRESLRN LRGYYNQSEA (SEC ID N° 103)

GSHTLQRMYG CDVGPDGRLR RGYNQFAYDG KDYIALNEDL SSWTAADTAA  
 QITQRKWEAA REAEQLRAYL EGTCVEWLRR HLENGKETLQ RA (SEC ID N° 104)

- 10 Según otra realización preferida, la presente invención se refiere a los fragmentos de proteínas que están codificados por SEC ID N° 74 o SEC ID N° 75. La secuencia de estos fragmentos puede obtenerse convirtiendo las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID N° 74 ó 75 en las secuencias de aminoácidos correspondientes. Las secuencias de aminoácidos se muestran a continuación como SEC ID N° 105 y 106, respectivamente.

GSHSMRYFYT AMSRPGRGEP RFIAVGYVDD TQFVRFSDA ASPRTEPRAP  
 WIEQEGPEYW DRNTQIFKTN TQTYRENLR I ALRYYNQSEA (SEC ID N° 105)

- 15 GSHTWQTMYG CDVGPDGRLR PGHNQYAYDG KDYIALNEDL SSWTAADTAA  
 QITQRKWEAA REAEQLRAYL EGLCVEWLRR HLENGKESLQ RA (SEC ID N° 106)

- 20 Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también desvela un procedimiento para la detección de uno o más de los fragmentos de proteínas identificados como SEC ID N° 24, 25, 103, 104, 105 y/o 106 en una muestra. Dicho procedimiento puede ser uno de los procedimientos serológicos muy conocidos mencionados anteriormente (Terasaki y McClelland, 1964; Kissmeyer y col., 1969).

- 25 Según la presente memoria descriptiva también se desvela un antisuero o un ligando que se une a un polipéptido según la invención. El término "un ligando" se refiere a cualquier molécula que puede unirse a los polipéptidos de la presente invención. El último término se refiere específicamente a anticuerpos policlonales y/o monoclonales producidos específicamente (mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica) contra los polipéptidos de la presente invención y también engloba cualquier construcción similar a anticuerpo, y otras, como se describe en detalle en el documento WO 98/58965 a Lorré y col.

La presente memoria descriptiva desvela adicionalmente un kit para la detección de un polipéptido de la invención que comprende al menos un antisuero o un ligando como se ha descrito anteriormente.

**Definiciones**

- 30 Las siguientes definiciones y explicaciones permitirán un mejor entendimiento de la presente invención.

El material diana en las muestras que van analizarse puede ser tanto ADN como ARN, por ejemplo, ADN genómico,

ARN mensajero o versiones amplificadas de los mismos. Estas moléculas también se llaman en la presente solicitud "ácidos polinucleicos".

Están disponibles procedimientos de extracción y purificación muy conocidos para el aislamiento de ARN o ADN de una muestra (por ejemplo, en Sambrook y col., 1989).

- 5 Un "nucleótido polimórfico" se refiere a un nucleótido de la secuencia de un alelo de HLA dado que se diferencia en al menos uno de los nucleótidos que se encuentran en la posición correspondiente en otros alelos de HLA del mismo locus.

El término "tipado" de un alelo de HLA se refiere a la identificación del alelo, es decir, la detección del alelo y la discriminación del alelo de otros alelos del mismo locus.

- 10 El término "sonda" según la presente invención se refiere a un oligonucleótido monocatenario que se diseña para hibridarse específicamente con ácidos polinucleicos de HLA. Preferentemente, las sondas de la invención tienen aproximadamente 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. Longitudes de sondas particularmente preferidas incluyen 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó  
15 25 nucleótidos. Los nucleótidos como se usan en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

- 20 El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos monocatenaria que puede actuar de punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión de cebadores que es complementario a la cadena de ácido nucleico que va a copiarse. La longitud y la secuencia del cebador deben ser de forma que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. Preferentemente, el cebador tiene aproximadamente 5-50 nucleótidos de longitud. La longitud y la secuencia específica dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, además de las condiciones a las que se usa el cebador, tal como temperatura y fuerza iónica. Debe entenderse que los cebadores de la presente invención pueden usarse como sondas y viceversa, a condición de que se adapten las condiciones experimentales.

- 25 La expresión "par de cebadores adecuado" en la presente invención se refiere a un par de cebadores que permite la amplificación específica de un fragmento de ácido polinucleico de HLA.

- 30 El término "región diana" de una sonda o un cebador según la presente invención es una secuencia dentro de los ácidos polinucleicos de HLA para la que la sonda o el cebador es completamente complementario o parcialmente complementario (es decir, con algún grado de desapareamiento). Debe entenderse que el complemento de dichas secuencias diana también es una secuencia diana adecuada en algunos casos.

"Hibridación específica" de una sonda con una región diana de los ácidos polinucleicos de HLA significa que dicha sonda forma un dúplex en parte de esta región o con la región entera bajo las condiciones experimentales usadas, y que bajo aquellas condiciones dicha sonda no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que va a analizarse.

- 35 "Hibridación específica" de un cebador con una región diana de los ácidos polinucleicos de HLA significa que, durante la etapa de amplificación, dicho cebador forma un dúplex con parte de esta región o con la región entera bajo las condiciones experimentales usadas, y que bajo aquellas condiciones dicho cebador no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que va a analizarse. Debe entenderse que "dúplex" como se usa por la presente memoria significa un dúplex que conducirá a la amplificación específica.

- 40 "Amplificación específica" de un fragmento de los ácidos polinucleicos de HLA significa la amplificación del fragmento para el que los cebadores se diseñaron, y no de cualquier otro fragmento de los ácidos polinucleicos presentes en una muestra.

- 45 El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que emparejarse exactamente con la secuencia diana correspondiente en el molde para garantizar la apropiada amplificación está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok y col., 1990). Sin embargo, cuando los cebadores no son completamente complementarios a su secuencia diana, debe tenerse en cuenta que los fragmentos amplificados tendrán la secuencia de los cebadores y no de la secuencia diana. Los cebadores pueden marcarse con una marca de elección (por ejemplo, biotina). El procedimiento de amplificación usado puede ser tanto reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki y col., 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren y col., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991),  
50 amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli y col., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS; Kwok y col., 1989), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA; Duck, 1990) o amplificación por medio de Q $\beta$  replicasa (Lomeli y col., 1989) o cualquier otro procedimiento adecuado para amplificar moléculas de ácidos nucleicos conocido en la técnica.

- 55 Las secuencias de sondas y cebadores se representan por toda la memoria descriptiva como oligonucleótidos de ADN monocatenario del extremo 5' al 3'. Es obvio para el experto en la materia que cualquiera de las sondas

especificadas a continuación puede usarse como tal, o en su forma complementaria, o en su forma de ARN (en la que T está sustituido con U).

5 Las sondas según la invención pueden prepararse clonando plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si necesita ser por escisión de estas últimas de los plásmidos clonados usando las nucleasas adecuadas y recuperándolas, por ejemplo, por fraccionamiento según peso molecular. Las sondas según la presente invención también pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, por el procedimiento de fosfotriéster convencional.

10 Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos tales como fosforotiatos (Matsukura y col., 1987), alquilfosforotiatos (Miller y col., 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen y col., 1991; Nielsen y col., 1993), o pueden contener agentes intercalantes (Asseline y col., 1984). Al igual que la mayoría de las otras variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la invención, estas variaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones bajo las cuales el oligonucleótido debe usarse para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados de hibridación eventuales serán esencialmente los mismos que aquellos obtenidos con los oligonucleótidos sin modificar. La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa con el fin de influir positivamente características tales como la cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas de oligonucleótidos, etc.

20 El término "soporte sólido" puede referirse a cualquier sustrato con el que una sonda de oligonucleótidos puede acoplarse, a condición de que retenga sus características de hibridación y a condición de que el nivel de hibridación de referencia permanezca bajo. Normalmente, el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico con el fin de facilitar la fijación o mejorar la eficiencia de hibridación. Tales modificaciones pueden englobar resolución de homopolímeros, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH<sub>2</sub>, grupos SH, grupos carboxílicos o acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

30 El término "marcado" se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcado puede llevarse a cabo por el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de polimerasa de la amplificación tal como se ilustra por Saiki y col. (1988) o Bej y col. (1990), o cebadores marcados, o por cualquier otro procedimiento conocido para el experto en la materia. La naturaleza de la marca puede ser isotópica (<sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

La "muestra biológica" puede ser, por ejemplo, sangre, muestra de la boca o cualquier otra muestra que comprenda ADN genómico.

Para diseñar sondas con características deseadas pueden aplicarse las siguientes pautas útiles conocidas para el experto en la materia.

35 Debido a que el grado y la especificidad de las reacciones de hibridación tal como aquellas descritas en la presente memoria están afectadas por varios factores, la manipulación de uno o más de aquellos factores determinará la sensibilidad y la especificidad exacta de una sonda particular, tanto si es perfectamente complementaria a su diana como si no. La importancia y el efecto de diversas condiciones de ensayo se explican adicionalmente en la presente memoria.

40 \*\*La estabilidad del híbrido de ácido nucleico de [sonda : diana] debe elegirse para ser compatible con las condiciones de ensayo. Esto pueden llevarse a cabo evitando secuencias ricas en AT largas, terminando los híbridos con pares de bases G:C y diseñando la sonda con una Tf apropiada. Los puntos de inicio y fin de la sonda deben elegirse de manera que la longitud y el % de GC produzcan una Tf de aproximadamente 2-10°C superior a la temperatura a la que se realizará el ensayo final. La composición de bases de la sonda es significativa debido a que pares de bases G-C presentan mayor estabilidad térmica con respecto a pares de bases A-T debido a puentes de hidrógeno adicionales. Por tanto, la hibridación que implica ácidos nucleicos complementarios de mayor contenido de G-C será más estable a mayores temperaturas.

45 \*\* También deben tenerse en cuenta condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación bajo las que se usará una sonda cuando se diseñe una sonda. Se sabe que el grado de hibridación aumentará a medida que aumenta la fuerza iónica de la mezcla de reacción, y que la estabilidad térmica de los híbridos aumentará con fuerza iónica creciente. Por otra parte, reactivos químicos tales como formamida, urea, DMSO y alcoholes, que rompen enlaces de hidrógeno, aumentarán la rigurosidad de la hibridación. La desestabilización de los puentes de hidrógeno por tales reactivos puede reducir enormemente la Tf. En general, la hibridación óptima para sondas de oligonucleótidos sintéticas de aproximadamente 10-50 bases de longitud se produce aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la óptima puede permitir hibridar secuencias de bases despareadas y, por tanto, pueden producir especificidad reducida.

5 \*\*Se desea tener sondas que se hibridan sólo en condiciones de alta rigurosidad. Bajo condiciones de alta rigurosidad sólo se formarán híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios; no se formarán híbridos sin un grado de complementariedad suficiente. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones del ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácidos nucleicos que forman un híbrido. El grado de rigurosidad se elige de forma que se maximice la diferencia en la estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el ácido nucleico no diana. \*\*Regiones en el ADN o ARN diana que se sabe que forman estructuras internas fuertes inhibidoras para la hibridación son menos preferidas. Asimismo, deberían evitarse sondas con amplia auto-complementariedad. Como se ha explicado anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas individuales de ácidos nucleicos complementarios para formar una doble cadena unida por hidrógeno. Es implícito que si una de las dos cadenas está completamente o parcialmente implicada en un híbrido, será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. Pueden ser híbridos intramoleculares e intermoleculares formados dentro de las moléculas de un tipo de sonda si puede haber suficiente auto-complementariedad. Tales estructuras pueden evitarse mediante el cuidadoso diseño de las sondas. Diseñando una sonda de manera que una porción sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, la tasa y el grado de hibridación puede aumentarse enormemente. Están disponibles programas informáticos para buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en ciertos casos, puede no ser posible evitar este tipo de interacción.

10 \*\*Las condiciones de hibridación y lavado convencionales se desvelan en la sección de Materiales y procedimientos de los ejemplos. Otras condiciones son, por ejemplo, 3X SSC (solución salina de citrato de sodio), 20% de FA (formamida) desionizada a 50°C. También pueden usarse otras disoluciones (SSPE (solución salina de fosfato de sodio-EDTA), TMAC (cloruro de tetrametilamonio), etc.) y temperaturas a condición de que se mantenga la especificidad y sensibilidad de las sondas. Si se necesita, tienen que llevarse a cabo ligeras modificaciones de las sondas en longitud o en secuencia para mantener la especificidad y sensibilidad requerida bajo las circunstancias dadas.

15 El término “tampón de hibridación” significa un tampón que permite una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, bajo las condiciones de rigurosidad apropiadas.

El término “disolución de lavado” significa una disolución que permite lavar los híbridos formados bajo las condiciones de rigurosidad apropiadas.

### 30 Leyendas de figuras y tablas

La **Figura 1** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB1\*0820. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.

35 La **Figura 2** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB1\*04new. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

40 La **Figura 3** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB4\*01new. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 6.

45 La **Figura 4** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*3913. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 8.

La **Figura 5** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*1406. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 10.

50 La **Figura 6** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*51new. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 12.

**Tabla 5.** Cebadores usados para la amplificación del exón 2/exón 3 del alelo de HLA B\*3913, el alelo de HLA B\*1406 y/o el alelo de HLA B\*51new.

55 **Tabla 6.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*3913. La primera columna muestra números de referencia para algunas de las sondas. Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.

**Tabla 7.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*1406. La primera columna muestra números de referencia para las sondas. Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.

**Tabla 8.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA B\*51new. La primera columna muestra números de referencia para las sondas. Las secuencias se facilitan de 5' a 3'.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB1\*0820.

El alelo DRB1\*0820 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. Bart Vandekerckhove del laboratorio de inmunohematología en el Bloedtransfusiecentrum Oost-Vlaanderen en Bélgica. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con la mezcla de cebadores múltiples que consiste en cebadores con SEC ID N° 4 a 9 como cebador de 5' y DRBP3'gen (SEC ID N° 10) como cebador del extremo 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

15 10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*0820:

```

CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT ACG TCT GAG TGT CAT TTC TTC AAT
GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT AAC CAA
GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG
GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG
AAG GAC TTC CTG GAA GAC AGG CGG GCC CTG GTG GAC ACC TAC TGC
AGA CAC AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA

```

(SEC ID N° 1)

### 25 Ejemplo 2. Tipado del alelo DRB1\*0820

El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB1\*0820 en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 1. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes mezclas de cebadores: tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10) como un cebador múltiple (tal como la mezcla compuesta por los cebadores con SEC ID N° 4 a SEC ID N° 9) combinado con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10) o un cebador genérico combinado con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB1\*0820 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las sondas con SEC ID N° 13 a SEC ID N° 17 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB1\*0820 y cualquier otro alelo DRB1 presentemente conocido al nivel alélico. Sin embargo, en muestras clínicas están presentes dos alelos DRB1 diferentes, que complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB asociados (DRB3, DRB4, DRB5), que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB1. En la Figura 1, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBP5'gen (SEC ID N° 3) y DRBP3'gen

(SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas con SEC ID N° 13 a 17 de la Tabla 2. La Figura 1 muestra el resultado del ensayo de hibridación.

5 Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB1\*0820 está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*04012 y los alelos asociados DRB4\*01011 y DRB4\*0103 (estos alelos asociados tienen secuencias idénticas en el exón 2). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo DRB1\*0820 se hibrida con las sondas (líneas) 9, 21, 25, 26 y 44 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 13, 16, 15, 14 y 17 respectivamente).

10 Ejemplo 3. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB1\*04new.

El alelo DRB1\*04new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. P. Jindra del Hematologicko-onkologicke odd en Plzen, República checa. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

15 En un primer experimento, el exón 2 se clonó en el vector pGEMt (Promega, Madison, WI, EE.UU.) después de la amplificación con el cebador DRBp5'gen (SEC ID N° 3) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

20 10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,041% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los cebadores SP6 y T7 proporcionados por Eurogentec (Seraing, Bélgica). Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

25

**G ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA CCT GAG**  
**TGT CAT TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC**  
**TTC TAT CAC CAA GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG**  
**TAC CGG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC**  
**AGC CAG AAG GAC CTC CTG GAG CAG AAG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAC**  
**TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA**

(SEC ID N° 68)

30

La posición de los cebadores genéricos usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

En un segundo experimento, el exón 2 se amplificó con el cebador DRBp5'DR4 (SEC ID N° 52) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

35 5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA,

40



EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

**A CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA CCT GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG ACG**  
 GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT CAC CAA GAG GAG TAC  
 GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG GTG ACG GAG CTG  
 GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAC CTC CTG GAG  
 CAG AAG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAC TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTT  
 GGT GAG **AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA** (SEC ID N° 69)

5

La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

#### Ejemplo 4. Tipado del alelo DRB1\*04new.

El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB1\*04new en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el  
 10 Ejemplo 3. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes mezclas de cebadores: tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10) como un cebador múltiple (tal como la mezcla compuesta por los cebadores con SEC ID N° 4 a SEC ID N° 9 o la mezcla compuesta de cebadores con SEC ID N° 4, 5, 52, 7, 8 y 9) combinado con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10) o un cebador genérico combinado  
 15 con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 μM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB1\*04new puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las  
 20 sondas con SEC ID N° 55 a SEC ID N° 61 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB1\*04new y cualquier otro alelo DRB1 presentemente conocido al nivel alélico. Sin embargo, en muestras clínicas están presentes dos alelos DRB1 diferentes, que complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB asociados (DRB3, DRB4, DRB5), que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB1. En la Figura 2, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBp5'gen (SEC ID N° 3) y DRBp3'gen (SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas  
 25 con SEC ID N° 55 a 61 de la Tabla 3. La Figura 2 muestra el resultado del ensayo de hibridación. Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB1\*04new (líneas 12, 26, 36, 37, 42, 43, 56) está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*1104 (líneas 2, 9, 25, 30, 33, 44, 56) y dos de los alelos asociados DRB4\*01011 (líneas 15, 36, 41, 44, 60, 62) y DRB3\*0202 (líneas 6, 26, 36, 43, 60). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo  
 35 DRB1\*04new se hibrida con las sondas (líneas) 12, 26, 36, 37, 42, 43 y 56 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 55, 58, 60, 61, 56, 57 y 59 respectivamente).

#### Ejemplo 5. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB4\*01new.

El alelo DRB4\*01new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. Bohuslava Jilkova del HLA-Laboratory en Hradec Kralove, República checa. Se prepararon ácidos  
 40 polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

En un primer experimento, el exón 2 se clonó en el vector pGEMt (Promega, Madison, WI, EE.UU.) después de la amplificación con el cebador DRBp5'intron (SEC ID N° 53) como cebador de 5' y DRBp3'intron (SEC ID N° 107) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

45

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)



10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los cebadores SP6 y T7 proporcionados por Eurogentec (Seraing, Bélgica). Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB4\*01new:

**AC CGG ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA** CGT TTC TTG GAG CAG GCT AAG TGT  
 GAG TGT CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG CGA GTG TGG AAC CTG ATC AGA TAC  
 ATC TAT AAC CAA GAG GAG TAC GCG CGC TAC AAC AGT GAT CTG GGG GAG TAC  
 CAG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAC GCT GAG TAC TGG AAC AGC CAG  
 AAG GAC CTC CTG GAG CGG AGG CGG GCC GAG GTG GAC ACC TAC TGC AGA TAC  
 AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA **GGT GAG CAT GGT**  
**GGA GGG CGG G** (SEC ID N° 70)

La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

En un segundo experimento, el exón 2 se amplificó con el cebador DRB4p5' (SEC ID N° 54) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

- 15 5 min a 95°C
- 35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)
- 10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

**TAA GTG TGA GTG TCA TTT CCT** CAA TGG GAC GGA GCG AGT GTG GAA CCT GAT  
 CAG ATA CAT CTA TAA CCA AGA GGA GTA CGC GCG CTA CAA CAG TGA TCT GGG  
 GGA GTA CCA GGC GGT GAC GGA GCT GGG GCG GCC TGA CGC TGA GTA CTG GAA  
 CAG CCA GAA GGA CCT CCT GGA GCG GAG GCG GGC CGA GGT GGA CAC CTA CTG  
 CAG ATC AAC TAC GGG GTT GTG GAG **AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA**  
 (SEC ID N° 71)

La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

Ejemplo 6. Tipado del alelo DRB4\*01new.

El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB4\*01new en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 5. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes combinaciones de cebadores de 5' y de 3': por ejemplo, tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10 o SEC ID N° 53 y SEC ID N° 107) como un cebador específico tal como SEC ID N° 54, posiblemente en una mezcla compuesta por otros cebadores de 5' usados para la amplificación de diferentes alelos DRB (por ejemplo SEC ID N° 4 a 9) combinado

con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10 ó 107) o un cebador genérico combinado con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB4\*01new puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las sondas con SEC ID N° 62 a SEC ID N° 66 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB4\*01new y cualquier otro alelo DRB4 presentemente conocido al nivel alélico. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB1 y otros alelos asociados (DRB3, DRB4, DRB5) que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB4. Esto complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. En la Figura 3, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBp5'gen (SEC ID N° 3) y DRBp3'gen (SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador de DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas con SEC ID N° 62 a 66 de la Tabla 4. La Figura 3 muestra el resultado del ensayo de hibridación. Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB4\*01new está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*0403 (líneas 15, 20, 26, 36, 37, 42, 44), DRB1\*1301 (líneas 9, 16, 23, 26, 28, 30, 44, 56) y DRB3\*0206 (líneas 6, 26, 36, 43). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo DRB4\*01new se hibrida con las sondas (líneas) 15, 36, 44, 60 y 62 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 62, 63, 64, 65 y 66 respectivamente).

#### Ejemplo 7. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*3913.

El alelo B\*3913 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico brasileño. La muestra se recogió por el Dr. ME Moraes del Lab de Immunogenética, HSE/INCA, Río de Janeiro, Brasil. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas:

- 1 min a 96°C
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)
- 10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)
- 15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)
- 10 min a 72°C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, 200 µM de dNTP, 2,5 U de Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 µg de ADN. El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias, correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\*3913:

```
GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC
TTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAG
TCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCGGAGTATTGGGACCGGG
AGACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC
TACTACAACCAGAGCGAGGCCG
```

exón 2 (SEC ID N° 22)

GGTCTCACACCCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC  
 GGGCATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC  
 CTGGACCGCGGCGGACACCCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGTGG  
 CGGAGCAGCTGAGAACCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAG  
 AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG

exón 3 (SEC ID N° 23)

Ejemplo 8. Tipado del alelo B\*3913.

- El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*3913 en una muestra, se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 7. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26) e IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 7. El alelo HLA-B\*3913 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 4 muestra el resultado de un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la Figura 4 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*3913, en combinación con el alelo HLA-B\*52012 conocido. Los números en la Figura 4 indican sondas que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas no son las mismas sondas que aquellas en las Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo HLA-B\*3913 se hibrida con las siguientes sondas (líneas) sobre la tira: 2 (SEC ID N° 30), 7 (SEC ID N° 32), 10 (SEC ID N° 34), 13 (SEC ID N° 35), 18 (SEC ID N° 36), 19 (SEC ID N° 37), 26 (SEC ID N° 39), 28 (SEC ID N° 42), 36 (SEC ID N° 47), 38 (SEC ID N° 45), 50 (SEC ID N° 38), 53 (SEC ID N° 43) y 56 (SEC ID N° 28).

Ejemplo 9. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*1406.

- El alelo B\*1406 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico belga. La muestra se recogió por el Dr. MP Emonds del Bloodtransfusion Center, Lovaina, Bélgica. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas:

- 25 1 min a 96°C  
 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)  
 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)  
 10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)  
 15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)  
 30 10 min a 72°C

- La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, 200 μM de dNTP, 2,5 U Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 μg de ADN. El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias, correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\* 1406:

GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC  
 TTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAG  
 TCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAATATTGGGACCGGA  
 ACACACAGATCTGCAAGACCAACACACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC  
 TACTACAACCAGAGCGAGGCCG exón 2 (SEC ID N° 72)

GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC  
 GGGTATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC  
 CTGGACCGCGGGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGG  
 CGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAG  
 AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG exón 3 (SEC ID N° 73)

Ejemplo 10. Tipado del alelo B\*1406.

5 El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*1406 en una muestra, se basa en la tecnología de  
 LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp,  
 como se indica en el Ejemplo 9. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26) e  
 IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 9. El alelo  
 HLA-B\*1406 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de  
 10 oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 5 muestra el resultado de  
 un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha  
 descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de  
 HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la  
 Figura 5 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*1406. Los números en la Figura 5 indican sondas  
 que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas no son las mismas sondas que aquellas en las  
 15 Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo HLA-B\*1406 se hibrida con las siguientes sondas  
 (líneas) sobre la tira: 2 (SEC ID N° 30), 7 (SEC ID N° 32), 9 (SEC ID N° 79), 16 (SEC ID N° 80), 17 (SEC ID N° 81),  
 19 (SEC ID N° 37), 26 (SEC ID N° 83), 31 (SEC ID N° 87), 36 (SEC ID N° 47), 50 (SEC ID N° 82) y 55 (SEC ID N°  
 89).

Ejemplo 11. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*51new.

20 El alelo B\*51new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico brasileño. La muestra se  
 recogió por el Dr. ME Moraes del Lab de Immunogenética, HSE/INCA, Río de Janeiro, Brasil. Se prepararon ácidos  
 polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el  
 protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR  
 consistió en las siguientes etapas:

- 25 1 min a 96°C
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)
- 10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)
- 15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)
- 30 10 min a 72°C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, dNTP 200 μM, 2,5 U  
 Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 μg de ADN. El análisis de secuencias de  
 nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster  
 City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism<sup>TM</sup> Ready Reaction Dye Terminator  
 35 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de  
 secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias,  
 correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\*51new:



GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCGTGTCCCGCCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC  
 TTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGAGGTTGCACAGCGACGCCGCGAG  
 TCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAATATTGGGACCGGA  
 ACACACAGATCTGCAAGACCAACACACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC  
 TACTACAACCAGAGCGAGGCCG exón 2 (SEC ID N° 74)

GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC  
 GGGTATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC  
 CTGGACCGCGGGCGGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGG  
 CGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAG  
 AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG exón 3 (SEC ID N° 75)

Ejemplo 12. Tipado del alelo B\*51new.

5 El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*1406 en una muestra, se basa en la tecnología de  
 LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp,  
 como se indica en el Ejemplo 11. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26)  
 e IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 11. El alelo  
 HLA-B\*51new puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de  
 10 oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 6 muestra el resultado de  
 un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha  
 descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de  
 HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la  
 Figura 6 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*51new, en combinación con el alelo HLA-B\*1501  
 conocido. Los números en la Figura 6 indican sondas que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas  
 15 no son las mismas sondas que aquellas en las Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo  
 HLA-B\*51new se hibrida con las siguientes sondas (líneas) sobre la tira: 3 (SEC ID N° 90), 6 (SEC ID N° 91), 9 (SEC  
 ID N° 79), 14 (SEC ID N° 92), 18 (SEC ID N° 93), 23 (SEC ID N° 98), 31 (SEC ID N° 87), 35 (SEC ID N° 99), 46 (SEC  
 ID N° 94), 49 (SEC ID N° 95), 52 (SEC ID N° 100), 55 (SEC ID N° 89).

**Referencias**

20 Andersson G, Larhammar D, Widmark E, Serenius B, Peterson PA y Rask L (1987) Class II genes of the  
 human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DRbeta genes. J.  
 Biol. Chem 262:8748-8758.

Apple RJ y Erlich HA (1996) HLA classII genes: structure and diversity. Chapter 5 HLA and MHC: genes,  
 molecules and function. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.

25 Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F y Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high  
 affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. Proc. Natl.  
 Acad. Sci. USA 81:3297-3301.

Barany F (1991) The ligase chain reaction in a PCR world. PCR Methods Appl. 1:5-16.

30 Bej A, Mahbubani M, Miller R, Di Cesare J, Haff L y Atlas R (1990) Multiplex PCR amplification and immobilized  
 capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. Mol. Cell Probes 4:353-365.

Campbell RD y Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. Immunology Today 14:349-352.

Clay TM, Culpan D, Howell WM, Sage DA, Bradley BA y Bidwell JL (1994) UHG crossmatching. A comparison  
 with PCR-SSO typing in the selection of HLA-DPB-compatible bone marrow donors. Transplantation 58: 200-  
 207.

35 Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350: 91-92.

Duck P (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. Biotechniques 9: 142-147.

- Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D y Gengeras T (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878.
- 5 Hirschorn K, Bach F, Kolodny RL y Firschen IL (1963) Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* 142: 1185-1187.
- Kissmeyer NF, Svejgaard A y Hauge M (1969) The HLA system defined with lymphocytotoxic and platelet antibodies in relation to kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 1: 357-361.
- 10 Kwok D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L y Gengeras T (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177.
- Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C y Sinisky J (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 18: 999-1005.
- 15 Landgren U, Kaiser R, Sanders J y Hood L (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241:1077-1080.
- Lomeli H, Tyagi S, Pritchard C, Lisardi P y Kramer F (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin. Chem.* 35: 1826-1831.
- 20 Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J y Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7706-7710.
- Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K y Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18: 5134-5143.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Gold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1: 263-273.
- 25 Mullis KB y Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Nielsen P, Egholm M, Berg R y Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254:1497-1500.
- 30 Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res.* 21:197-200.
- Olerup O y Zetterquist H (1991) HLA-DRB1\*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 37: 197-204.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn G, Mullis KB y Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
- 35 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH y Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234.
- 40 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ y Rich SS (1992) HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB and DQA genes. *Hum. Immunol.* 33: 69-81.
- Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce JM, Jacino MT, Myster SH, Barbosa JJ, Faras AJ y Rich SS (1993) HLA class I sequence-based typing. *Hum. Immunol.* 37: 39-50.
- 45 Spencer WR y Parham P (1996) HLA class I genes: structure and diversity. Chapter 4. *HLA and MHC: genes, molecules and function*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.
- Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H y Maertens G (1993) Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 74:

1093-1102.

Terasaki PH y McClelland JD (1964) Microdotlet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1007.

Townsend A y Bodmer H (1989) Antigen recognition by Class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 601-624.

5 Wu D y Wallace B (1989) The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 4: 560-569.

Yang SY (1987) A standardised method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. *Immunobiology of HLA. Histocompatibility testing* (ed. B Dupont). Springer-Verlag, New York, USA. pp. 332-335.

10 Yoshida M, Kimura A, Numano F y Sasazuki T (1992) Polymerase-chain-reaction-based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum. Immunol.* 34: 257-266.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> INNOGENETICS N.V.  
 <120> Procedimiento para el tipado de alelos de HLA  
 <130> PCT99.86.HLA  
 10 <140> PCT/EP99/02614  
 <141> 19-04-1999  
 <150> 98870088.6  
 15 <151> 20-04-1998  
 <160> 107  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 20 <210> 1  
 <211> 269  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 cacgttttctt ggagtactct acgtctgagt gtcatttctt caatgggacg gagcgggtgc 60  
 ggttcctgga cagatacttc tataaccaag aggagtacgt gcgcttcgac agcgacgtgg 120  
 gggagtaccg ggcggtgacg gagctggggc ggctgatgc cgagtactgg aacagccaga 180  
 aggacttctt ggaagacagg cgggccctgg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg 240  
 ttgtggagag cttcacagtg cagcggcga 269
- 30 <210> 2  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens
- 35 <400> 2  
 Arg Phe Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Glu Cys His Phe Phe Asn Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu Glu Tyr  
 20 25 30  
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu  
 35 40 45  
 Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Phe Leu Glu  
 50 55 60  
 Asp Arg Arg Ala Leu Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly Val  
 65 70 75 80  
 Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg  
 85
- <210> 3  
 <211> 24



# ES 2 390 017 T3

	<212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 3 gatccttctgt gtccccacag cacg	24
10	<210> 4 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 4 ccccacagca cgtttcttgg agtactc	27
20	<210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 5 tgtccccaca gcacgttct tgtg	24
30	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 6 tttcttgag caggtaaac	20
40	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 7 cacgttctt gaagcaggat aagtt	25
50	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 8 cacagcacgt ttctggagg	20
60	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 9 ctgtggcagc ctaagagg	18
	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 10 tcgccgctgc actgtgaagc tc	22
	<210> 11 <211> 16 <212> ADN	

# ES 2 390 017 T3

	<213> Homo sapiens	
5	<400> 11 attcccgcgc cgcgct	16
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 12 ctgcactgtg aagctctcca	20
15	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 13 gtactctacg tctgagtg	18
25	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 14 gcctgatgcc gagtactgg	19
35	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 15 agaaggactt cctggaaga	19
45	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 16 agccaggcgg gccctggtgg a	21
55	<210> 17 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 17 ggggtgtgg agagc	15
65	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 18 ttctcaatg ggacggag	18
	<210> 19 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	

ES 2 390 017 T3

<400> 19  
 ttctggaca gatactc 18

5 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 20  
 caagaggagt acgtgcg 18

<210> 21  
 <211> 18  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 ggggagtacc gggcggg 18

20 <210> 22  
 <211> 270  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 22  
 gctcccactc catgaggat ttctacacct ccgtgtcccg gcccggccgc ggggagcccc 60  
 gcttcatctc agtgggctac gtggacgaca cgcagttcgt gaggttcgac agcgacgccg 120  
 cgagtccgag agaggagccg cgggcgccgt ggatagagca ggagggggccg gagtattggg 180  
 accgggagac acagatctcc aagaccaaca cacagactta ccgagagagc ctgcggaacc 240  
 tgcgcggcta ctacaaccag agcgaggccg 270

30 <210> 23  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 ggtctcacac cctccagagg atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg cgcctcctcc 60  
 gcgggcataa ccagttcgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac gaggacctga 120  
 gtccttgac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg gaggcggccc 180  
 gtgtggcgga gcagctgaga acctacctgg agggcacgtg cgtggagtgg ctccgcagat 240  
 acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg 276

35 <210> 24  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 390 017 T3

```

-----
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
 1                               5                               10                               15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
                               20                               25                               30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg
                               35                               40                               45
Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr
                               50                               55                               60
Gln Ile Ser Lys Thr Asn Thr Gln Thr Tyr Arg Glu Ser Leu Arg Asn
 65                               70                               75                               80
Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
                               85                               90

```

5 <210> 25  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

```

<400> 25
Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp
 1                               5                               10                               15
Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asn Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
                               20                               25                               30
Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr
                               35                               40                               45
Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Val Ala Glu
                               50                               55                               60
Gln Leu Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
 65                               70                               75                               80
Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala
                               85                               90

```

10 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 26  
 gggaggagcg aggggaccsc ac 22

20 <210> 27  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 27  
 ggaggccatc cccggcgacc tat 23

# ES 2 390 017 T3

	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 28	
	gggacacgga ggtgtaga	18
10		
	<210> 29	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 29	
	ccggcccggc cgcggg	16
20		
	<210> 30	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	
	gcttcatctc agtgggct	18
25		
	<210> 31	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 31	
	gttcgtgagg ttcgaca	17
35		
	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 32	
	gagtccgaga gaggagccg	19
40		
	<210> 33	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
45		
	<400> 33	
	ggccggagta ttgggac	17
50		
	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 34	
	ggaccgggag acacagat	18
60		
	<210> 35	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	agatctcaa gaccaac	17
65		
	<210> 36	

ES 2 390 017 T3

	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 36 cacagactta ccgagag	17
	<210> 37	
	<211> 17	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 37 accgagagag cctgcgg	17
15	<210> 38	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 38 cggaacctgc gcggcta	17
	<210> 39	
25	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 39 agaggatgta cggctgc	17
	<210> 40	
	<211> 16	
	<212> ADN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 40 gacgtggggc cggacg	16
40	<210> 41	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 41 gacgggcgcc tcctccg	17
	<210> 42	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 42 tcctccgagg gcataaccag	20
55	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
60	<400> 43 gggcataacc agttcgct	19
	<210> 44	
65	<211> 18	

ES 2 390 017 T3

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5 <400> 44  
gaggacctga gctcctgg 18

10 <210> 45  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

15 <400> 45  
cggcccgtgt ggcggag 17

20 <210> 46  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

25 <400> 46  
gcagctgaga acctacct 18

30 <210> 47  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

35 <400> 47  
tggagggcac gtgcgtg 17

40 <210> 48  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

45 <400> 48  
cgtggagtgg ctccgc 16

50 <210> 49  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

55 <400> 49  
tccgcagata cctggaga 18

60 <210> 50  
<211> 243  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
 tttcttggag caggttaaac ctgagtgtca tttcttcaac gggacggagc ggggtgcggtt 60  
 cctggacaga tactttctatc accaagagga gtacgtgcgc ttcgacagcg acgtggggga 120  
 gtaccgggcg gtgacggagc tggggcgcc tgatgccgag tactggaaca gccagaagga 180  
 cctcctggag cagaagcggg ccgcggtgga cacctactgc agacacaact acgggggttg 240  
 tga 243

55 <210> 51  
<211> 80  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 390 017 T3

<400> 51

Phe Leu Glu Gln Val Lys Pro Glu Cys His Phe Phe Asn Gly Thr Glu  
 1 5 10 15

Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr His Gln Glu Glu Tyr Val  
 20 25 30

Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly  
 35 40 45

Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln  
 50 55 60

Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly Val Gly  
 65 70 75 80

5

<210> 52

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 52

acgtttcttg gacgaggtta aac 23

15 <210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 53

accggatcct tcgtgtcccc acag 24

<210> 54

<211> 19

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 54

taagtgtag tgcatcttc 19

30 <210> 55

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <400> 55

cagaagcggg ccgcg 15

<210> 56

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 56

45 atcaccaaga ggagtacgtg 20

<210> 57

<211> 20



ES 2 390 017 T3

	<212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 57 cacaactacg gggttggtga	20
10	<210> 58 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 58 gcctgatgcc gagtactgg	19
20	<210> 59 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 59 gccgcggtgg acacc	15
30	<210> 60 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 60 ccagaaggac ctctgga	18
40	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 61 cagatacttc taccaccaag a	21
50	<210> 62 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 62 gggccgaggt ggaca	15
60	<210> 63 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 63 ccagaaggac ctctgga	18
70	<210> 64 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
75	<400> 64 ggggtgtgg agagc	15
80	<210> 65 <211> 16 <212> ADN	

ES 2 390 017 T3

<213> Homo sapiens

<400> 65  
 5 gaggagtacg cgcgct 16

<210> 66  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10  
 <400> 66  
 gagcgagtgt ggaacc 16

<210> 67  
 <211> 270  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15  
 <400> 67  
 cacgtttcct ggagcaggct aagtgtgagt gtcatttcct caatgggacg gagcgagtgt 60  
 ggaacctgat cagatacatc tataaccaag aggagtacgc gcgctacaac agtgatctgg 120  
 gggagtacca ggcggtgacg gagctggggc ggcctgacgc tgagtactgg aacagccaga 180  
 aggacctcct ggagcggagc cgggccgagc tggacaccta ctgcagatac aactacgggg 240  
 ttgtggagag cttcacagtg cagcggcgag 270

20  
 <210> 68  
 <211> 289  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25  
 <400> 68  
 gatccttcgt gtccccacag cacgtttcct ggagcagggt aaacctgagt gtcatttcct 60  
 caacgggacg gagcgggtgc ggttcttggc cagatacttc tatcaccaag aggagtacgt 120  
 gcgcttcgac agcgacgtgg gggagtaccg ggcggtgacg gagctggggc ggcctgatgc 180  
 cgagtactgg aacagccaga aggacctcct ggagcagaag cgggccgcgg tggacaccta 240  
 ctgcagacac aactacgggg ttggtgagag cttcacagtg cagcggcgca 289

30  
 <210> 69  
 <211> 268  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35  
 <400> 69  
 acgtttcctg gagcaggtta aacctgagtg tcatttcctc aacgggacgg agcgggtgcg 60  
 gttcctggac agatacttct atcaccaaga ggagtacgtg cgcttcgaca gcgacgtggg 120  
 ggagtaccgg gcggtgacgg agctggggcg gcctgatgcc gagtactgga acagccagaa 180  
 ggacctcctg gagcagaagc gggccgcggt ggacacctac tgcagacaca actacgggg 240  
 tggtgagagc ttcacagtgc agcggcgca 268

40  
 <210> 70  
 <211> 315  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 70

ES 2 390 017 T3

accggatcct tcgtgtcccc acagcacgtt tcttgagca ggctaagtgt gagtgtcatt 60  
 tcctcaatgg gacggagcga gtgtggaacc tgatcagata catctataac caagaggagt 120  
 acgcgcgcta caacagtgat ctgggggagt accaggcgtt gacggagctg gggcggcctg 180  
 acgctgagta ctggaacagc cagaaggacc tcctggagcg gaggcgggcc gaggtggaca 240  
 cctactgcag atacaactac ggggttgtgg agagcttcac agtgcagcgg cgaggtgagc 300  
 atggtggagg gcggg 315

<210> 71  
 <211> 249  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 71  
 taagtgtgag tgtcatttcc tcaatgggac ggagcagtg tggaaacctga tcagatacat 60  
 ctataaccaa gaggagtacg cgcgctacaa cagtgatctg ggggagtacc aggcggtgac 120  
 ggagctgggg cggcctgacg ctgagtactg gaacagccag aaggacctcc tggagcggag 180  
 gcgggccgag gtggacacct actgcagatc aactacgggg ttgtggagag cttcacagtg 240  
 cagcggcga 249

10 <210> 72  
 <211> 270  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 72  
 gctcccactc catgaggat ttctacaccg ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc 60  
 gcttcatctc agtgggctac gtggacgaca cgcagttcgt gaggttcgac agcgacgccg 120  
 cgagtccgag agaggagccg cgggcgccgt ggatagagca ggaggggccg gaatattggg 180  
 accggaacac acagatctgc aagaccaaca cacagactga ccgagagagc ctgcggaacc 240  
 tgcgcggcta ctacaaccag agcgaggccg 270

20 <210> 73  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 73  
 ggtctcacac cctccagagg atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg cgcctcctcc 60  
 gcgggtataa ccagttcgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac gaggacctga 120  
 gtcctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg gaggcggccc 180  
 gtgaggcggg gcagctgaga gcctacctgg agggcacgtg cgtggagtgg ctccgcagac 240  
 acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg 276

25 <210> 74  
 <211> 270  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 74  
 gctcccactc catgaggat ttctacaccg ccatgtcccg gcccgccgc ggggagcccc 60  
 gcttcattgc agtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gaggttcgac agcgacgccg 120  
 cgagtccgag gacggagccc cgggcgccat ggatagagca ggaggggccg gagtattggg 180  
 accggaacac acagatcttc aagaccaaca cacagactta ccgagagaac ctgcggatcg 240  
 cgctccgcta ctacaaccag agcgaggccg 270

ES 2 390 017 T3

<210> 75  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 75  
 ggtctcacac ttggcagacg atgtatggct gcgacgtggg gccggacggg cgcctcctcc 60  
 ccgggcataa ccagtacgcc tacgacggca aagattacat cgccctgaac gaggacctga 120  
 gctcctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg gaggcggccc 180  
 gtgaggcggg gcagctgaga gcctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg ctccgcagac 240  
 acctggagaa cgggaaggag tcgctgcagc gcgcgg 276

<210> 76  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 76  
 15 tctacaccgc cgtgtcc 17

<210> 77  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 77  
 gcgacgccgc gagtccga 18

<210> 78  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 78  
 30 ggccggaata ttgggac 17

<210> 79  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 79  
 40 ggaccggaac acacag 16

<210> 80  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45

<400> 80  
 acagatctgc aagacca 17

<210> 81  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 81  
 55 acagactgac cgagag 16

<210> 82  
 <211> 19

ES 2 390 017 T3

	<212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 82 ggaacctgcg cggctacta	19
10	<210> 83 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 83 agaggatgta cggctg	16
20	<210> 84 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 84 cgacgtgggg ccggacg	17
30	<210> 85 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 85 gggtataacc agttcgct	19
40	<210> 86 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 86 aggacctgag ctctctg	17
50	<210> 87 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 87 gcccgtgagg cggagc	16
60	<210> 88 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 88 gcagctgaga gcctacct	18
70	<210> 89 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
75	<400> 89 ccgcagacac ctggaga	17
80	<210> 90 <211> 18 <212> ADN	

ES 2 390 017 T3

	<213> Homo sapiens	
	<400> 90	
5	gcttcattgc agtgggct	18
	<210> 91	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 91	
	cgagtccgag gacggagccc egg	23
	<210> 92	
15	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 92	
20	cagatcttca agaccaac	18
	<210> 93	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 93	
	cacacagact taccgagag	19
30	<210> 94	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 94	
	cgagagaacc tgcggatc	18
	<210> 95	
	<211> 17	
40	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 95	
45	cggatcgcgc tccgcta	17
	<210> 96	
	<211> 17	
	<212> ADN	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 96	
	tctacaccgc catgtcc	17
	<210> 97	
55	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 97	
60	gcgacgccgc gagtccg	17
	<210> 98	
	<211> 17	
	<212> ADN	
65	<213> Homo sapiens	

ES 2 390 017 T3

<400> 98  
acacttgcca gacgatg 17

5 <210> 99  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

10 <400> 99  
ggagggcctg tgcgtg 16

<210> 100  
<211> 19  
15 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 100  
cataaccagt acgcctacg 19

20 <210> 101  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

25 <400> 101  
gtggagtggc tccgc 15

<210> 102  
30 <211> 16  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 102  
35 gacgggcgcc tcctcc 16

<210> 103  
<211> 90  
<212> PRT  
40 <213> Homo sapiens

<400> 103  
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly  
1 5 10 15  
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln  
20 25 30  
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg  
35 40 45  
Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr  
50 55 60  
Gln Ile Cys Lys Thr Asn Thr Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn  
65 70 75 80  
Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala  
85 90

45 <210> 104  
<211> 92  
<212> PRT

ES 2 390 017 T3

<213> Homo sapiens

<400> 104 \_ \_ \_

Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp  
1 5 10 15

Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asn Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp  
20 25 30

Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr  
35 40 45

5

Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu  
50 55 60

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg  
65 70 75 80

His Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala  
85 90

<210> 105

<211> 90

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Met Ser Arg Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln  
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Thr Glu Pro Arg  
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr  
50 55 60

Gln Ile Phe Lys Thr Asn Thr Gln Thr Tyr Arg Glu Asn Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala  
85 90

15

<210> 106

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 106



ES 2 390 017 T3

Gly Ser His Thr Trp Gln Thr Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Leu Leu Pro Gly His Asn Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp  
 20 25 30  
 Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr  
 35 40 45  
 Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu  
 50 55 60  
 Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Leu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg  
 65 70 75 80  
 His Leu Glu Asn Gly Lys Glu Ser Leu Gln Arg Ala  
 85 90

<210> 107

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 107 21

10 cccgccctcc accatgctca c

21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new en una muestra, definiéndose el exón 2 y el exón 3 de dichos alelos por SEC ID N° 22 y 23, SEC ID N° 72 y 73, y SEC ID N° 74 y 75, respectivamente, en el que dicho procedimiento comprende:
- i) amplificar un fragmento de dicho alelo que comprende todo o parte del exón 2 y/o todo o parte del exón 3 de dicho alelo usando al menos un par adecuado de cebadores;
- ii) determinar la ausencia o presencia de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new en la muestra.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de los alelos se determina por el uso de un conjunto de sondas, hibridándose las sondas de dicho conjunto específicamente con regiones diana que comprenden uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o en el exón 3 de dichos alelos.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** adicionalmente **porque**:
- dichos nucleótidos polimórficos tienen las siguientes posiciones en el exón 2:
- 15 11, 24, 30, 33, 44, 46, 68, 69, 71, 88, 92, 94, 102, 120, 131, 132, 133, 136, 140, 149, 153, 155, 161, 173, 174, 183, 186, 188, 190, 193, 196, 197, 198, 199, 200, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 212, 219, 226, 228, 229, 236, 238, 240, 241, 244, 246 y 268, y
- dichos nucleótidos polimórficos tienen las siguientes posiciones en el exón 3:
- 2, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 26, 36, 44, 54, 66, 68, 69, 75, 76, 77, 92, 120, 134, 141, 142, 145, 156, 159, 163, 169, 184, 195, 196, 197, 201, 214, 216, 217, 227, 228, 229 y 240.
- 20 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** adicionalmente **porque** dichos cebadores se eligen de SEC ID N° 26 y 27.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado** adicionalmente **porque** dichas sondas se eligen de:
- SEC ID N° 28 a 49 para el tipado de HLA-B\*3913;
- 25 SEC ID N° 29, 30, 32, 37, 41, 47, 48 y 76-89 para el tipado de HLA-B\*1406; y
- SEC ID N° 33, 44, 79, 84, 87 y 89-102 para el tipado de HLA-B\*51new.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que las sondas están inmovilizadas sobre un soporte sólido.
- 30 7. Uso de un ácido polinucleico aislado que consiste en el gen HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 o HLA-B\*51new y que comprende la secuencia que consiste en el exón 2 o el exón 3 de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 o HLA-B\*51new definidos por SEC ID N° 22, 72 y 74, respectivamente, o cualquier fragmento de los mismos que consiste en 10 a 25 nucleótidos, como un cebador o como una sonda para el tipado de dicho alelo.
8. Uso de al menos un cebador y/o sonda como se define en la reivindicación 7 para la fabricación de un kit de diagnóstico para el tipado de los alelos HLA-B\*3913, HLA-B\*1406 y/o HLA-B\*51new.
- 35 9. Un fragmento de proteína como se define por SEC ID N° 24 ó 25, SEC ID N° 103 ó 104, o SEC ID N° 105 ó 106, codificado por SEC ID N° 22 ó 23, SEC ID N° 72 ó 73, o SEC ID N° 74 ó 75, respectivamente.

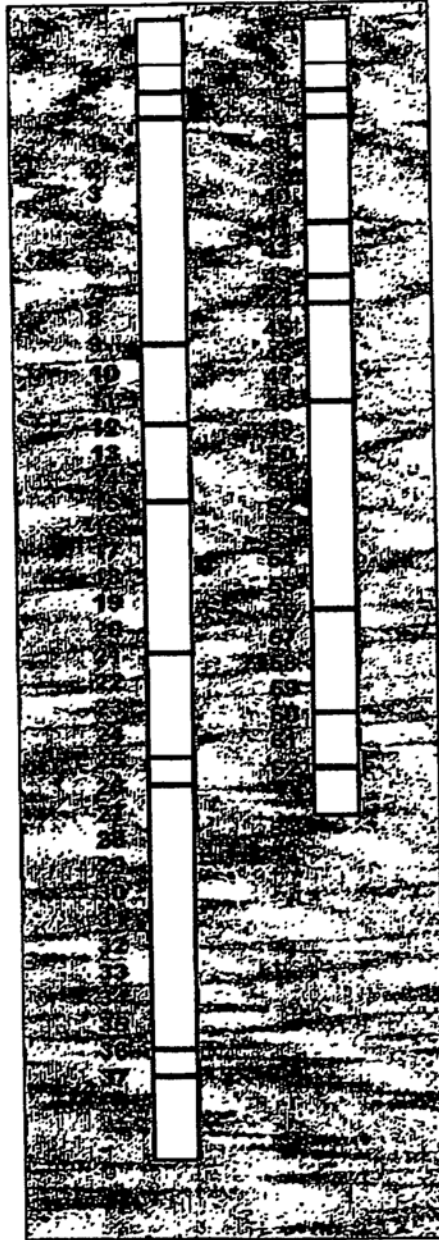


Figura 1



Figura 2



Figura 3

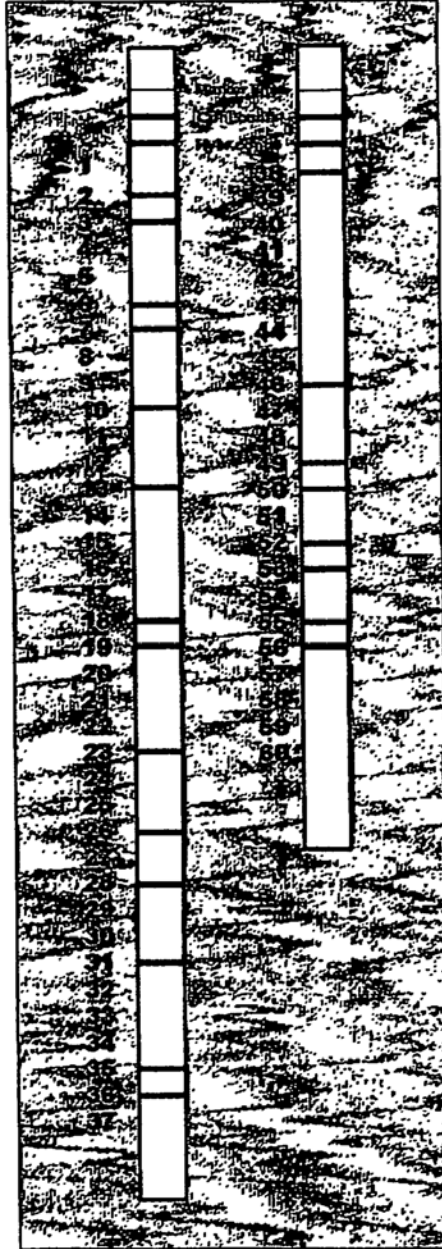


Figura 4



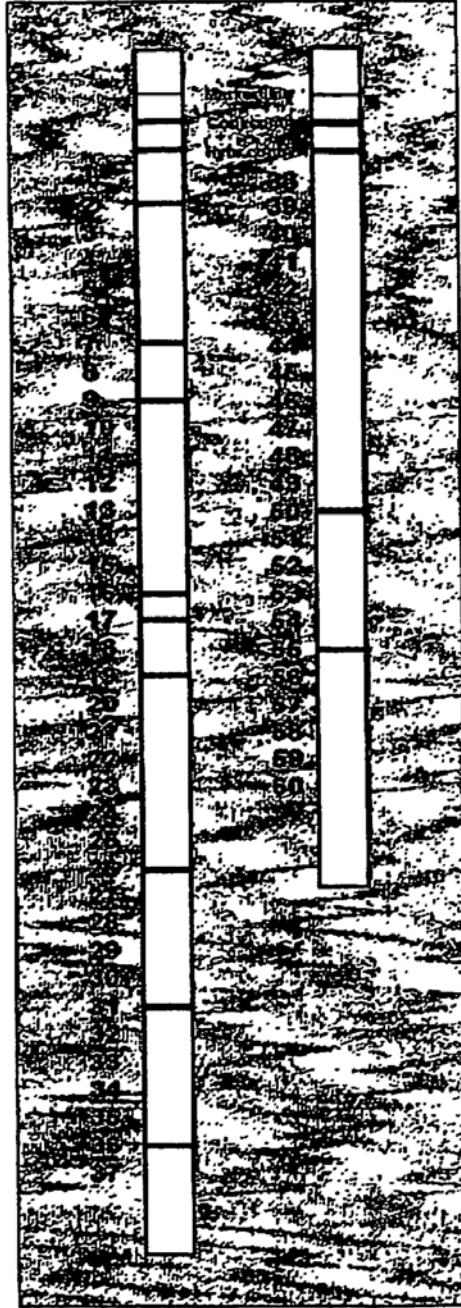


Figura 5



Figura 6